

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年2月8日 (08.02.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/09322 A1

(51)国際特許分類?: C12N 15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21,
C12P 21/02, C07K 14/705, 16/28, C12Q 1/02

(21)国際出願番号: PCT/JP00/05069

(22)国際出願日: 2000年7月28日 (28.07.2000)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願平11/248036 1999年7月29日 (29.07.1999) JP
特願平11/300253 1999年8月27日 (27.08.1999) JP
60/159,590 1999年10月18日 (18.10.1999) US
特願2000/118776 2000年1月11日 (11.01.2000) JP
60/183,322 2000年2月17日 (17.02.2000) US
特願2000/183767 2000年5月2日 (02.05.2000) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所(HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3
Chiba (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 太田紀夫 (OTA, Toshio) [JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-7-105 Kanagawa (JP). 磐貝隆夫 (ISOGAI, Takao) [JP/JP]; 〒300-0303 茨城県稻敷郡阿見町大室511-12 Ibaraki (JP). 西川哲夫 (NISHIKAWA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒173-0013 東京都板橋区永川町27-3-403 Tokyo (JP). 林 浩司 (HAYASHI, Koji) [JP/JP]; 〒299-0125 千葉県市原市有秋台西1-9-446 Chiba (JP). 斎藤 薫 (SAITO, Kaoru) [JP/JP]; 〒292-0056 千葉県木更津市木更津2-8-1-201 Chiba (JP). 山本順一 (YAMAMOTO, Jun-ichi) [JP/JP]; 〒292-0041 千葉県木更津市清見台東3-28-3-A101 Chiba (JP). 石井静子 (ISHII, Shizuko) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那4508-19-202

(54)Title: GUANOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING PROTEIN COUPLED RECEPTORS, GENES THEREOF AND PRODUCTION AND USE OF THE SAME

A1 (54)発明の名称: グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、ならびにそれらの製造および用途

WO 01/09322 A1 (57)Abstract: A plural number of full-length cDNAs are isolated from a human placental tissue cDNA library by an oligocap method which has been originally developed for isolating full-length cDNAs. Among these cDNAs, a clone (C-PLACE1003238) encoding a G protein-coupled receptor, which has a hydrophobic region seemingly consisting of 7 transmembrane domains, is isolated. Comparison of the expression of C-PLACE1003238 in tumor tissues with the expression thereof in normal tissues indicates that its expression is enhanced in colonic cancer and pancreatic cancer but reduced in testicular cancer. Comparison of the expression dose of C-PLACE1003238 gene in the brain of a patient with Alzheimer's disease with the expression dose thereof in a normal adult indicates that its expression is lowered in the frontal lobe of the patient with Alzheimer's disease but elevated in the hippocampus. These facts suggest that C-PLACE1003238 might relate to cancer and Alzheimer's disease.

/統葉有/



(57) 要約:

完全長 cDNA を単離するために独自に開発したオリゴキャップ法により、ヒト胎盤組織 cDNA ライブラリーから完全長 cDNA を複数単離し、その中から 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を有する G 蛋白質共役型受容体をコードするクローン (C-PLACE1003238) を単離した。C-PLACE1003238 の腫瘍組織での発現を正常組織での発現と比較すると、結腸癌及び肺臓癌では発現が増強していたが、精巣癌では正常と比較して発現が減少していた。また、アルツハイマー病患者の脳における C-PLACE1003238 遺伝子の発現量を正常成人における発現量と比較した結果、アルツハイマー病患者の前頭葉では発現が低下し、海馬では増加していることが判明した。これら事実から、C-PLACE1003238 には、癌やアルツハイマー病との関連が示唆された。

明細書

グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、
ならびにそれらの製造および用途

技術分野

本発明は、新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、ならびにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

G蛋白質共役型受容体(G protein-coupled receptors/GPCR)は、三量体型GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体群の総称である。G蛋白質共役型受容体は、分子内に細胞膜貫通領域を7回有する構造上の特性から、「7回膜貫通型受容体」とも呼ばれる。G蛋白質共役型受容体は様々な生理活性物質の情報を、三量体型GTP結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型GTP結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介するcAMP、フォスフォリバーゼCを介するCa²⁺などがよく知られているが、三量体型GTP結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた(Annu. Rev. Neurosci. (97) 20:399)。G蛋白質共役型受容体に対する基質(リガンド)は、大変多岐に渡っており、タンパク性ホルモン、ケモカイン、ペプチド、アミン、脂質由来物質、さらにはトロンビンの様なプロテアーゼもその一例となる。現在、遺伝子が同定されたG蛋白質共役型受容体の数は感覚器受容体を除くと、ヒトで300個弱存在するが、リガンドが同定されたG蛋白質共役型受容体の数は、そのうち約140種類に過ぎず、リガンド未知な「オーファン G蛋白

質共役型受容体」が100種類以上存在している。しかしながら実際のヒトゲノム中には、少なくとも400種類、場合によっては1000種類ものG蛋白質共役型受容体が存在する、とも想定されている (Trends Pharmacol. Sci. (97) 18:430)。この事は、今後のゲノム解析の飛躍的進展に伴って、機能未知なオーファンG蛋白質共役型受容体の数も爆発的に増加する事を意味している。

これまでに世界の製薬企業により創られてきた薬剤は、その9割以上が細胞外空間での相互作用を標的としており、その中でもG蛋白質共役型受容体に関連する低分子薬は約半数を占めている。その根拠としては、G蛋白質共役型受容体が関連する疾患が、遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系など、非常に多くの領域に関連することにある。そのため、最近では多くの製薬企業がゲノム解析で明らかとなったオーファンG蛋白質共役型受容体を所有し、リガンド探索と生理機能の解明に鋏を削っている。こうした状況を背景として、最近では新規G蛋白質共役型受容体の生理的リガンド探索の成功例も報告され始めている。例えば、calcitonin gene-related peptide受容体 (J. Biol. Chem. (96) 271:11325)、orexin (Cell (98) 92:573)そしてprolactin-releasing peptide (Nature (98) 393:272)などの事例は、生命科学分野での基礎研究としても大きな衝撃を持つ事例であった。

特に、オーファンG蛋白質共役型受容体は新たな薬剤開発に繋がる可能性の高い標的として、多大な注目を集めている。一般的にオーファンG蛋白質共役型受容体には特異的なリガンドが見出されていないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーとハイスクループットスクリーニングとを組み合わせることで、オーファンG蛋白質共役型受容体を標的とした薬剤の創製が提唱されている (Trends Pharmacol. Sci. (97) 18:430, Br. J. Pharm. (98) 125:1387)。すなわち、遺伝子操作によって同定されたオーファンG蛋白質共役型受容体を、細胞内セカンドメッセンジャーであるcAMP, Ca²⁺の変化を指標とした機能スクリーニングにより生理的アゴニ

ストを発見し、生体内機能解析を行うというものである。この際、化合物ライブラリーを利用して、スクリーニングをハイスループット化することにより、オーファンG蛋白質共役型受容体に対する特異的な代替（surrogate）アゴニスト及びアシタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発も理論的には可能となる。

発明の開示

本発明の目的は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、ならびにそれらの製造および用途を提供することにある。さらに当該分子を医薬品の開発研究の標的として提供することを目的とする。

本発明者らは、上記の課題を解決するために、まず、完全長 cDNA を単離するために独自に開発したオリゴキャップ法により、ヒト胎盤組織 cDNA ライブラリーから完全長 cDNA を複数単離した。

単離した cDNA の一つにつき塩基配列を決定し、その構造解析を行なったところ、7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を有していたため、該 cDNA は G 蛋白質共役型受容体をコードしていることが判明した（このクローンを「C-PLACE E1003238」と命名した）。

C-PLACE1003238 は、レチノイン酸処理により分化誘導した神経細胞に対し阻害剤を添加するとその発現が増加したことから神経疾患との関連が示唆される。また、紫外線照射によって発現が低下することから皮膚癌への関連も考えられる。

また、C-PLACE1003238 は、正常組織においては肺、胎盤、皮膚などの組織において高い発現を示した。腫瘍組織での発現を正常組織での発現と比較すると、結腸癌及び肺臓癌では発現が増強していた。他方、精巣癌では正常と比較して発現が減少していた。また、アルツハイマー病患者の脳における C-PLACE1003238 遺伝子の発現量を正常成人における発現量と比較した結果、アルツハイマー病患者の前頭葉では発現が低下し、海馬では増加していることが判明した。これら事実か

ら、C-PLACE1003238には、癌やアルツハイマー病との関連が示唆された。

本発明は、新規なG蛋白質共役型受容体C-PLACE1003238および該受容体をコードするDNA、並びにそれらの製造および用途に関し、より詳しくは、

(1) グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記(a)から(d)のいずれかに記載のDNA、

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

(d) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAにストリングエントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA、

(3) (1)または(2)に記載のDNAを含有するベクター、

(4) (1)または(2)に記載のDNAまたは(3)に記載のベクターを保持する形質転換体、

(5) (1)または(2)に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド、

(6) (4)に記載の形質転換体を用いて蛋白質またはペプチドを発現させる工程、および発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、(5)に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (5)に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であつて、

(a) (5)に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(8) (5) に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で(5)に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程(a)で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(9) (5) に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程(b)で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) (5) に記載の蛋白質に結合する抗体、

(11) (7) から(9)のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物、

(12) (11) に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物、

(13) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド、を提供するものである。

なお、本発明において「G蛋白質共役型受容体」とは、GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体を意味する。

本発明において「リガンド」とは、G蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達する生理的物質を意味する。ここで「生理的物質」とは、生体内

でG蛋白質共役型受容体に結合している化合物を意味する。

本発明において「アゴニスト」とは、G蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達しうる化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明において「アンタゴニスト」とは、リガンドがG蛋白質共役型受容体に結合すること、もしくは細胞内にシグナルを伝達することを阻害する化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明は、新規なG蛋白質共役型受容体および該蛋白質をコードするDNAを提供する。本発明に含まれる、本発明者らにより単離されたヒト由来のcDNAクローンを「C-PLACE1003238」と命名した。当該cDNAの塩基配列を配列番号：1に、当該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。BLAST検索の結果、当該cDNAがコードする蛋白質は、既知のG蛋白質共役型受容体と有意なアミノ酸配列上の相同性を示した。具体的には、「ヒトPAF (Platelet Activating Factor) 受容体」に対して25%の相同性を示した。また、本発明者等が単離したC-PLACE1003238 cDNAがコードする蛋白質は、いずれもG蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持していた。これら事実から、C-PLACE1003238 cDNAは、G蛋白質共役型受容体ファミリーに属する蛋白質をコードしていると考えられる。G蛋白質共役型受容体は、そのリガンドの作用によりG蛋白質の活性化を通じて細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性を有しており、上記したように遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系などの非常に多くの領域の疾患に関連している。特にC-PLACE1003238蛋白質は、その発現特性から癌やアルツハイマーとの関連が示唆される。C-PLACE1003238蛋白質は、C-PLACE1003238蛋白質の機能を調節するアゴニストやアンタゴニストなどのスクリーニングに利用することができ、これら分子は上記疾患に対する医薬品の開発の重要な標的となる。

本発明は、また、C-PLACE1003238蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。

ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質がC-PLACE1003238蛋白質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。C-PLACE1003238蛋白質が持つ生物学的特性としては、三量体型GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性が挙げられる。三量体型GTP結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、 Ca^{2+} を上昇させるGq型、cAMPを上昇させるGs型、そしてcAMPを抑制するGi型の3種類のカテゴリーに分類される (Trends Pharmacol. Sci. (99) 20:118)。従って、対象となる蛋白質がC-PLACE1003238蛋白質と同等の生物学的特性を有しているか否かは、例えば、その活性化による細胞内のcAMP濃度もしくはカルシウム濃度の変化を検出することにより評価することが可能である。

C-PLACE1003238蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の1つの態様としては、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法(*Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wiley & Sons Section 8.1-8.5*) が含まれる。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、C-PLACE1003238蛋白質のアミノ酸配列（配列番号：2）において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより変異した蛋白質であって、C-PLACE1003238蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。これら蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、C-PLACE1003238蛋白質の機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内であると考えられる。

C-PLACE1003238蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子增幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (*Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jh*

on Wily & Sons Section 6.3-6.4)を利用してC-PLACE1003238蛋白質をコードするDNA配列（配列番号：1）またはその一部をもとに同種または異種生物由来のDNA試料から、これと相同意性の高いDNAを単離して、該DNAからC-PLACE1003238蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることは、通常行いうことである。このようにC-PLACE1003238蛋白質をコードするDNAとハイブリダイズするDNAによりコードされる蛋白質であって、C-PLACE1003238蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。

このような蛋白質を単離するための生物としては、ヒト以外に、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

C-PLACE1003238蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを単離するためのストリンジエントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同意性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるDNAがコードする蛋白質は、通常、C-PLACE1003238蛋白質とアミノ酸配列において高い相同意性を有する。高い相同意性とは、少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、90%以上や95%以上）の配列の相同意性を指す。相同意性の特定は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。

また、遺伝子増幅技術（PCR）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4）を用いてC-PLACE1003238蛋白質をコードするDNA配列（配列番号：1）の一部を基にプライマーを設計し、C-PLACE1003238蛋白質をコードするDNA配列と相同性の高いDNA断片を単離し、該DNAを基にC-PLACE1003238蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることも可能である。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、リガンドに結合するがシグナル伝達を行なわないペプチドが含まれる。このようなペプチドを基に作製したアフィニティーカラムは、リガンドのスクリーニングに好適に用いることができる。また、本発明の蛋白質の部分ペプチドは、抗体作製に用いることも可能である。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適當なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。本発明の部分ペプチドは、通常、8アミノ酸残基以上、好ましくは12アミノ酸残基以上（例えば、15アミノ酸残基以上）である。

本発明の蛋白質は、組換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入したベクターを適當な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することが可能である。一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 16.1-16.19）。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) NAR 17:3129-31

44」参照)などにより本発明の蛋白質を調製することも可能である。

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードするDNAを提供する。本発明のDNAとしては、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNAの他、ゲノムDNA、化学合成DNAなども含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。本発明のDNAは、上記のように、C-PLACE1003238蛋白質をコードするDNA配列(配列番号:1)あるいはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれらDNA配列をもとに合成したプライマーを用いたPCR法等の常法により単離することが可能である。

また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製)などが好ましい。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内で蛋白質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター(プロメガ社製)、大腸菌であればpETベクター(Invitrogen社製)、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター(GenBank Accession No. AB009864)、pCEP4ベクター(Invitrogen社製)、生物個体であればpME18Sベクター(Mol Cell Biol. 8:466-472(1988))などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる(*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

また、本発明は、本発明のDNAまたは本発明のベクターを保持する形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。蛋白質製造のための產生系は、*in vit*

roおよびin vivo産生系がある。蛋白質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、293細胞などを例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

また、本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNA（配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖）に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合はU）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のDNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のDNAを增幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp～100bp、好ましくは15bp～35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15bpの鎖長のヌクレオチドが用いられる。このようなヌクレオチドは、好ましくは本発明の蛋白質をコードするDNAに特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリングエントな条件下で、本発明の蛋白質をコードするDNA（配列番号：1）とハイブリダイズし、他の蛋白質をコードするDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。

これらヌクレオチドは、本発明の蛋白質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、これらヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザ

ンハイブリダイゼーションやRT-PCRにより、本発明の蛋白質をコードするDNAの発現異常を検査することができる。また、これらヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により本発明の蛋白質をコードするDNAやその発現制御領域を增幅し、RFLP解析、SSCP、シークエンシング等の方法により、DNA配列の異常を検査・診断することができる。

また、これらヌクレオチドには、本発明の蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンスDNAが含まれる。アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。このようなアンチセンスDNAには、本発明の蛋白質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンスDNAは、例えば、本発明の蛋白質をコードするDNA（例えば、配列番号：1）の配列情報を基にホスホロチオネート法（Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)）などにより調製することが可能である。

本発明のヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、*ex vivo*法や*in vivo*法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従い本発明の蛋白質のアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成し、家兎に免疫することにより得ることが可能である（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel

el et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12-11.13)。モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製した蛋白質を用いてマウスを免疫し、その脾臓細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞を調製し、該ハイブリドーマ細胞から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、本発明の蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンプロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

また、本発明の蛋白質に結合する抗体を、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。本発明の抗体は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストとして作用し得る。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものに入れ換えたマウス（例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al.(1997) Nat.Genet.15:146-156」参照）に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組換えによって調製することができる(Methods in Enzymology 203, 99-121(1991))。

また、本発明は、本発明の蛋白質を利用した、本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、種々のG蛋白質共役型受容体のリ

ガンド活性については公知化合物やペプチド（例えば、ケミカルファイルに登録されているもの）あるいはファージ・ディスプレイ法（J. Mol. Biol. (1991) 222, 301-310）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、本発明の蛋白質のアフィニティーカラムに被検試料を接触させ本発明の蛋白質に結合する化合物を精製する方法、ウエストウエスタンプロッティング法など多くの公知の方法を利用することができる。これら方法を利用する場合には、被検試料は適宜標識し、この標識を利用して本発明の蛋白質との結合を検出することができる。また、これら方法の他に、本発明の蛋白質を発現する細胞膜を調製して、これをチップ上に固定し、リガンド結合時に三量体型GTP結合蛋白質が解離する事を、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance) の変化で検出する方法 (Nature Biotechnology (99) 17:1105) を用いることも可能である。

また、被検試料と本発明の蛋白質との結合活性は、被検試料が細胞表面に発現させた本発明の蛋白質へ結合することにより生じる細胞における変化を指標に検出することもできる。このような変化としては、例えば、細胞内のCa²⁺レベルの変化やcAMPレベルの変化が挙げられるが、これらに制限されない。具体的には、G蛋白質共役型受容体に対するアゴニスト活性はGTPγS結合法により測定できる。

この方法の1つの実施例として、G蛋白質共役型受容体を発現させた細胞膜を20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 μM GDP溶液中で、³⁵Sで標識されたGTPγS 400 pMと混合させ、被検試料存在下と非存在下でインキュベーショ

ン後、濾過（filtration）を行い、結合したGTP γ Sの放射活性を比較する手法を用いることができる。

またG蛋白質共役型受容体は、三量体型GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達するシステムを共有している。三量体型GTP結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、Ca²⁺を上昇させるGq型、cAMPを上昇させるGs型、そしてcAMPを抑制するGi型の3種類に分類される。このことを応用してGq蛋白 α サブユニットと他のG蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、リガンドスクリーニングの際の陽性シグナルをGqの細胞内伝達経路である、Ca²⁺上昇に帰結させることができるものである。上昇したCa²⁺レベルは、TRE (TPA responsive element) を上流に有するレポーター遺伝子系、Fluor-3などの染色指示薬そして蛍光蛋白aequorinなどの変化を指標として検出ができる。同様に、Gs蛋白 α サブユニットと他のG蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、陽性シグナルをGsの細胞内伝達経路である、cAMP上昇に帰結させ、CRE(cAMP-responsive element)を上流に有するレポーター遺伝子系での変化を指標とすることも可能である (Trends Pharmacol. Sci. (99) 20:118)。

このスクリーニング系において本発明の蛋白質を発現させる宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられるが、例えば、COS細胞、CHO細胞、HEK293細胞などを例示することができる。本発明の蛋白質を脊椎動物細胞で発現させるためのベクターとしては、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列や複製起点等を有するものを好適に用いることができる。例えば、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Mol. Cell. Biol. (1981)1,854-864) や、pEF-BOS (Nucleic Acids Res. (1990)18, 5322)、pCDM8 (Nature(1987)329, 840-842)、pCEP4 (Invitrogen社) などは、G蛋白質共役型受容体を発現させるのに有用なベクターである。ベクターへの本発明のDNAの挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in

Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。また、宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9. 1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL社製)、FuGENE6試薬 (ペーリングガーマンハイム社)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法により、リガンドが単離されれば、本発明の蛋白質とリガンドの相互作用を阻害する化合物のスクリーニングが可能となる。従って、本発明は、また、本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程(a)で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、コンビナトリアル・ケミストリ一技術 (Tetrahedron (1995) 51, 8135-8137) によって得られた化合物群、あるいはファージ・ディスプレイ法 (J. Mol. Biol. (1991) 222, 301-310) などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限はない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、あるいはアフィニティーカラムに結合した

形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、リガンドを放射性同位元素などで標識して、被検試料の存在下において本発明の蛋白質と接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、本発明の蛋白質とリガンドとの結合活性を低下させる化合物を、該リガンドに付された標識を基に検出する方法を用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に、細胞内の変化を指標にスクリーニングすることも可能である。即ち、本発明の蛋白質を発現する細胞に被検試料の存在下でリガンドを接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、該細胞における変化を減少させる化合物を選択することにより、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物をスクリーニングすることが可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に調製することができる。このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの候補となる。

また、本発明は、本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、(b) 該リガンドの本発明の蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程(b)で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法と同様に、コンビナトリアル・ケミストリー技術によって得られた化合物群、ファージ・ディスプレイ法などを応用して作成されたランダム・ペプチド群、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合

成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に調製することができる。被検試料接触後の細胞における変化は、上記のスクリーニング方法と同様に、細胞内の Ca^{2+} レベルやcAMPレベルの変化を指標に検出することができる。また、細胞内のシグナル伝達を検出する場合には、ルシフェラーゼなどをレポーター遺伝子とするレポーターアッセイ系等の測定系を利用して検出することも可能である。

この検出の結果、被検試料非存在下においてリガンドを接触させた場合の細胞における変化と比較して、被検試料を接触させた場合における細胞における変化が抑制されていれば、用いた被検試料は、本発明の蛋白質の活性を阻害する化合物であると判定される。逆に、被検試料が該細胞における変化を増強させれば、該化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進する化合物であると判定される。なお、ここでいう「本発明の蛋白質の活性の促進または阻害する」とは、本発明の蛋白質に対する直接的な作用であると、間接的な作用であるとを問わず、結果として本発明の蛋白質の活性が促進または阻害されることを指す。従って、このスクリーニングにより単離される化合物には、本発明の蛋白質またはリガンドに作用してこれらの結合を阻害または促進することにより本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物の他、これらの結合自体を阻害または促進しないが、結果として本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物も含まれる。このような化合物には、例えば、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害しないが、細胞内のシグナル伝達経路を阻害若しくは促進する化合物が含まれる。

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬

理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、一般的には、例えば、経口投与、経鼻投与、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、C-PLACE1003238と既報のG蛋白質共役型受容体との整列を示す図である。図中のTM_nは、n番目の膜貫通部位を示す。

図2は、図1の続きの図である。

図3は、図2の続きの図である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982) : "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

[実施例1] オリゴキャップ法によるヒト胎盤組織からのcDNAライブラリーの作製

ヒト胎盤組織より、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)記載の方法によりmRNAを抽出した。さらに、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)記載の方法にしたがって、オリゴ(d

T)セルロースカラム (Collaborative labs) を用い、poly(A)+ RNAを精製した。

該poly(A)+ RNAより、オリゴキャップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]によりcDNAライブラリーを作製した。配列番号：3で表される配列からなるオリゴキャップリソヌー（合成RNA）および配列番号：4で表される配列からなるオリゴ(dT)アダプターを用いて、文献 [鈴木・菅野, 蛋白質核酸 酶素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)]に記載してあるようにBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、配列番号：5で表される5'末端側および配列番号：6で表される3'末端側のPCRプライマーを用い、PCR (polymerase chain reaction)により2本鎖cDNAに変換し、得られたDNA断片をSfiIで切断した。次いで、DraI IIで切断したベクターpME18SFL3 (GenBank AB009864) にcDNAの方向性を決めてクローニングし、cDNAライブラリーを作製した。pME18SFL3のクローン化部位は非対称性のDraIIIサイトとなっており、cDNA断片の末端にはこれと相補的なSfiI部位を附加しているので、クローン化したcDNA断片はSRαプロモーターの下流に一方向性に挿入される。

[実施例2] ヒト胎盤組織から作製したcDNAライブラリー由来のcDNAクローンの解析

(1) cDNAクローンの単離

実施例1で作製したcDNAライブラリーの一部をジーンパルサー (Biorad社製)を用いてエレクトロポレーション法で大腸菌DH10B株に導入した。形質転換体は、アンビシリンを50 μg/mL含有するLB寒天培地上で培養して選択した。これらの形質転換体をアンビシリンを50 μg/mL含有するLB培地で一晩培養し、プラスミド自動抽出機PI100 (クラボウ社製) を用いてプラスミドを抽出した。

(2) 単離されたcDNAクローンの塩基配列の解析

これらの形質転換体より得たクローンのプラスミドDNAについて、DNAシーケン

シングル試薬(BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製)を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNAシーケンサー(ABI PRISM 377, PE Biosystems社製)で各cDNAクローンの5'末端または3'末端からの塩基配列を解析した。

5'末端側からの塩基配列の決定には配列番号：7で表されるME761FWを、3'末端側からの塩基配列の決定には配列番号：8で表されるME1250RVをシーケンス用プライマーとして用いた。

(3) cDNAクローンの5'末端配列と3'末端配列のクラスター化

(2)で決定したcDNAクローンの5'末端配列と3'末端配列を、それぞれ別々にクラスタリングした。すなわち、cDNAクローンの決定した5'末端及び3'末端からのシングルパスシーケンスデータは、各配列データとの間でBLAST解析を行い、同一遺伝子に由来すると思われるクローンのグループ化を行った。5'末端配列では相同性95%以上のコンセンサス配列が300塩基対以上、3'末端配列では相同性90%以上のコンセンサス配列が200塩基対以上の場合、同一グループとした5'末端配列グループ3'末端配列グループはさらに、同一クローンの5'末端配列と3'末端配列が同一グループ(クラスター)に属するようグループ(クラスター)化処理を行った。

(4) cDNAクローン配列の特徴付け

クローン配列の5'末端配列データは、次の方法に基づいて特徴付けした。

(1)GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により、ヒトや他生物のmRNA配列(権利化された配列を含む)やヒトEST配列に対して同一であるかを確認する。

(2)ヒトmRNA配列やヒトEST配列より5'末端端が長いかを確認する。

(3)全長性を予測するATGprプログラム[A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. Bioinformatics 14: 384-390 (1998)]により5'末端配列中のすべての開始コドンに由来するATGpr1、ATGpr2値を決定する。

(4) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により同一としたヒトEST配列数を決定する。

また、クローン配列の3'末端配列データの特徴付けは前出の(1)および(4)について行った。

これら特徴付けを行ったクローン配列のデータをもとに新規でかつ全長である可能性の高いcDNAクローンの選抜を行った。

(5) ヒトmRNA配列やヒトEST配列に対しての同一性5'末端の長さの比較

クローン配列の5'末端、および3'末端配列の、ヒトや他生物のmRNA配列に対する同一性は、各配列との比較配列部分の長さが200塩基以上で、94%以上一致の場合に同一と見なした。ヒトEST配列に対する同一性は5'末端配列との比較配列部分の長さが200塩基以上で、90%以上で一致の場合に同一と見なした。

ヒトmRNA配列を比較配列とし、5'末端の長さを比較する際には5'末端配列の長さがヒトmRNA配列より長い場合、または5'末端配列が翻訳開始コドンを含む場合、全長とした。比較対象配列がESTの場合には、データベース中のヒトEST配列より長く5'末端が伸びている場合、あるいは5'末端が短いクローンでも両者の差が50塩基以内である場合を便宜的に全長とし、それ以上短い場合を非全長とした。

(6) ATGprによる全長性の予測

全長性の予測にはATGpr [A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. Bioinformatics 14: 384-390 (1998)] による解析結果を用いた。ATGpr1値は計算値から全長である可能性を予測する値であり、ATGpr1値が高いほど全長である可能性が高い。なお、最大ATGpr1値及び最大ATGpr2値とは、クローン配列の5'末端配列に含まれるすべての開始コドンから予測されるATGpr1値及びATGpr2値の最大値を示し、特徴付けにはこの値を用いた。

(7) 相同性検索による同一EST配列数からの新規性の予測

5'末端配列3'末端配列それぞれに対して、GenBankを用いた相同性検索から求め

た。ヒトEST配列に対しては、5'末端配列との比較配列部分の長さが200塩基以上にわたって90%以上で一致する場合に同一とした。EST配列数はそのまま特徴付けに用い、新規性の指標とした。mRNA配列ばかりでなく、EST配列に対しても同一でない5'末端配列および3'末端配列をもつクローンは、新規な配列をコードする遺伝子である。同様に、同一のEST配列数が少ない5'末端配列、あるいは3'末端配列をもつクローンもまた、新規な配列をコードするcDNAクローンであると判定した。

(8) クラスターの特徴付け

5'末端配列3'末端配列をグループ化したクラスターを、次の観点に基づいて特徴付けした。

(1) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により、ヒトや他生物のmRNA配列（権利化された配列を含む）やヒトEST配列に対して同一であるか。

クラスターに含まれるすべての5'末端配列3'末端配列のうち、1配列でもmRNA配列に対して同一であった場合、そのクラスターはmRNA配列に対して同一なクラスターとした。

(2) ヒトmRNA配列やヒトEST配列より5'末端が長いか。

クラスターに含まれるすべての5'末端配列がmRNA配列やヒトEST配列に対して非全長であった場合、そのクラスターはmRNA配列やヒトEST配列に対して非全長であるクラスターとした。

(3) 全長性を予測するATGprプログラムによる5'末端配列中のすべての開始コドンに由来するATGpr1値およびATGpr2値。

全長性を予測するATGprプログラム [A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. Bioinformatics 14: 384-390 (1998)] による5'末端配列中のすべての開始コドンに由来するATGpr1値は、クラスターに含まれる5'末端配列すべてに対してATGpr1値の最大値を、クラスターにおけるATGpr1値とした。ATGpr2値も同様にした

。

(4) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により同一としたヒトEST配列数。

クラスターに含まれる5'末端配列3'末端配列それぞれに対してEST配列数の最大値を求め、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数3'末端配列の同一EST配列数とした。

(9) 特徴付けからのクラスターの選抜方法

特徴付けにより得られたデータから、まず、ヒトや他生物のmRNA配列（権利化された配列を含む）と同一なクラスター、及び非全長なクラスターを除いた。それらクラスターの中から、次の条件のいずれかを満たすものを選抜した。

(a) クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が20以下で、クラスターにおけるATGpr1値が0.3を越えるクラスター。

(b) クラスターにおけるATGpr1値が0.3以下のクラスターであっても、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が5以下で、かつ、クラスターにおける3'末端配列の同一EST配列数も5以下で、かつ、クラスター内に複数のクローナンが含まれるクラスター。

(c) クラスターにおけるATGpr1値が0.3以下のクラスターであっても、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が0で、かつ、クラスターにおける3'末端配列の同一EST配列数が1以上であるクラスター。

(d) クラスターにおけるATGpr1値が0.3以下のクラスターであっても、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が1以上5以下で、かつ、クラスターにおける3'末端配列の同一EST配列数が0であるクラスター。

(a)で選抜されたクラスターには、少なくとも1クローナンは新規性も、全長性も高いクローナンが含まれている。(b),(c),(d)で選抜されたクラスターには、全長率は低くなるものの、依然として全長で、新規なクローナンが含まれている。

(10) クラスターからのクローナンの選抜方法

同一クラスター内に1クローンしか含まないものについては、そのクローンを選抜した。同一クラスター内に複数のクローンを含む場合で、ATGpr1値が0.3より大のクローンが複数ある場合は、ATGpr1値がより大きい方のクローンを選択した。同一クラスター内に複数のクローンを含む場合で、ATGpr1値が0.3以下のクローンが複数ある場合、ATGpr2値が0.3より大ならば、ATGpr2値がより大きい方のクローンを選択した。また、同一クラスター内に複数のクローンを含む場合で、ATGpr1値、ATGpr2値ともに0.3以下でも、クラスター内でATGpr1値、ATGpr2値がともに最大値をとるクローンがあるならば、そのクローンを選択した。同一クラスター内に複数のクローンを含む場合で、上記のようなATGpr値での選抜ができなかった場合は、5'末端配列3'末端配列及びヒトEST配列を用いてアセンブルすることにより、より5'末端側に長いクローンを選抜した。アセンブルには、Sequencher (Gene Codes社製) 等を利用し、一部、アセンブルすることによっても決められなかつた場合は、対象クローンすべてを全長と判断した。

(11) cDNAクローンの全長配列の解析

(1)～(10)のようにして選抜した、新規である可能性が高いと判断されたヒト胎盤組織由来のcDNAクローンについて、全長cDNAの塩基配列を決定した。塩基配列は主に、カスタム合成DNAプライマーを用いたダイテオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング（カスタム合成DNAプライマーを用い、PE Biosystem社製のDNAシーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応後、同社製のシーケンサーでDNA塩基配列を解析）によって決定した。全長塩基配列は上記方法により決定された部分塩基配列を完全にオーバーラップさせ最終的に確定した。次に、決定された全長のcDNAの塩基配列から推定アミノ酸配列を求めた。

(1)～(10)のようにして選抜した、新規でかつ完全長である可能性が高いと判断されたヒト胎盤組織由来のcDNAクローンの一例として、cDNAクローンC-PLACE1003238の塩基配列を配列番号：1に示した。また塩基配列から推定されたc

DNAクローンC-PLACE1003238がコードする遺伝子産物のアミノ酸配列を配列番号：2に示した。

[実施例2] ATGprとESTiMateFLでのcDNAの5'-末端の全長率の評価

ATGprは、ATGコドンの周辺の配列の特徴から翻訳開始コドンであるかどうかを予測するためにヘリックス研究所のA. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindellsにより開発されたプログラムである [A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells, Bioinformatics, 14: 384-390 (1998); <http://www.hri.co.jp/atg/pr/>]。結果は、そのATGが真の開始コドンである期待値（以下ATGpr1と記載することもある）で表した（0.05-0.94）。このプログラムを全長率65%のオリゴキャップ法で作製したライブラリーからのcDNAクローンの5'-末端配列に適用してATGpr1値を0.6以上でクローンを選択した場合、全長クローン（ORFのN-末端までもつクローン）評価の感度と特異性はともに82~83%まで上昇した。C-PLACE1003238の最大ATGpr1値は0.22であった。

[実施例3] 高密度DNAフィルターを用いた、ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析

ナイロン膜スポット用のDNAは以下のように調製した。すなわち、大腸菌を96穴プレートの各ウェルに培養し（LB培地で37°C、16時間）、その培養液の一部を、96穴プレートの10μLずつ分注した滅菌水中に懸濁し、100°Cで10分間処理した後、PCR反応のサンプルとして使用した。PCRはTakara PCR Amplification Kit（宝社製）を用い、プロトコールに従って1反応20μLの反応溶液を行った。プラスミドのインサートcDNAを増幅するために、プライマーはシーケンシング用のプライマーME761FW（5'tacggaaagtgttacttctgc3'／配列番号：7）とME1250RV（5'tgtgggaggttttctcta3'／配列番号：8）のペアー、またはM13M4（5'gtttcccgagtcacgac3'／配列番号：9）とM13RV（5'cagggaaacagctatgac3'／配列番号：10）のペアーを使用した。PCR反応は、GeneAmp System9600（PEバイオシステムズ社製）で、95°C5分間処理後、95°C10秒、68°C1分間で10サイクルし、さらに

98°C20 秒間、60°C3 分間で 20 サイクル行い、72°C10 分間で行った。PCR 反応後、2 μ L の反応液を 1% アガロースゲル電気泳動して、臭化エチジウムで DNA を染色し、増幅した cDNA を確認した。増幅できなかったものは、その cDNA インサートをもつプラスミドを、アルカリ抽出法 (J Sambrook, EF Fritsh, T Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory manual / 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) で調製した。

DNA アレイの作製は以下のように行った。384 穴プレートの各ウェルに DNA を分注した。ナイロン膜 (ペーリングラー社製) への DNA のスポットティングは、Biomek 2000 ラボラトリーオートメーションシステム (ベックマンコールター社製) の 384 ピンツールを用いて行った。すなわち、DNA の入った 384 穴プレートをセットした。その DNA 溶液に、ピンツールの 384 個の独立した針を同時に浸漬し、DNA を針にまぶした。その針を静かにナイロン膜に押し当てることによって、針に付着した DNA をナイロン膜にスポットティングした。スポットした DNA の変性および、ナイロン膜への固定は定法 (J Sambrook, EF Fritsh, T Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory manual / 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従って行った。

ハイブリダイゼーションのプローブとしては、ラジオアイソトープでラベリングした 1st strand cDNA を使用した。1st strand cDNA の合成は ThermoscriptTM RT-PCR System (GIBCO 社製) を用いて行った。すなわち、ヒトの各組織由来 mRNA (Clontech 社製) の 1.5 μ g と、1 μ L 50 μ M Oligo (dT)20 を用いて、50 μ Ci [α^{32} P]dATP を添加して付属のプロトコールに従って 1st strand cDNA を合成した。プローブの精製は、ProbeQuantTM G-50 micro column (アマシャムファルマシアバイオテック社製) を用いて付属のプロトコールに従って行った。次に、2 units E. coli RNase H を添加して、室温で 10 分間インキュベートし、さらに 100 μ g ヒト COT-1 DNA (GIBCO 社製) を添加して、97°Cで 10 分間インキュベート後、氷上に静置してハイブリダイゼーション用のプローブとした。

ラジオアイソトープラベルしたプローブの、DNA アレイへのハイブリダイゼーションは、定法 (J Sambrook, EF Fritsh, T Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory manual / 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従って行った。洗浄は、ナイロン膜を洗浄液1 (2X SSC, 1% SDS) 中で、室温 (約 26°C) で 20 分間のインキュベートを 3 回洗浄した後、洗浄液2 (0.1X SSC, 1% SDS) 中で、65°C で 20 分間の洗浄を 3 回行った。オートラジオグラムは、BAS2000 (富士写真フィルム社製) のイメージプレートを用いて取得した。すなわち、ハイブリダイゼーションしたナイロン膜をサランラップに包み、イメージプレートの感光面に密着させて、ラジオアイソトープ感光用のカッセットに入れて、暗所で 4 時間静置した。イメージプレートに記録したラジオアイソトープ活性は、BAS2000 を用いて解析し、オートラジオグラムの画像ファイルとして電子的に変換して記録した。各 DNA スポットのシグナル強度の解析は、Visage High Density Grid Analysis Systems (ジェノミックソリューションズ社製) を用いて行い、シグナル強度を数値データ化した。データは Duplicate で取得し、その再現性は 2 つの DNA フィルターを 1 つのプローブでハイブリダイゼーションして、両フィルターで対応するスポットのシグナル強度を比較した。全スポットの 95% が、相当するスポットに対して 2 倍以内のシグナル値であり、相関係数は $r=0.97$ である。データの再現性は十分といえる。

遺伝子発現解析の検出感度は、ナイロン膜にスポットした DNA に相補的なプローブを作製し、ハイブリダイゼーションにおける、プローブ濃度依存的なスポットのシグナル強度の増加を検討して見積もった。DNA としては、PLACE1008092 (GenBank Accession No. AF107253 と同一) を使用した。前述の方法で PLACE1008092 の DNA アレイを作製した。プローブとしては、PLACE1008092 の mRNA を *in vitro* 合成し、この RNA を鋳型として、前述のプローブ作製法と同様にして、ラジオアイソトープでラベリングした 1st strand cDNA を合成して使用した。PLACE1008092 の mRNA を *in vitro* 合成するために、pBluescript SK(-) の T7 プロモーター

側に PLACE1008092 の 5' 末端が結合されるように組換えたプラスミドを造成した。すなわち、pME18SFL3 の制限酵素 Dral II 認識部位に組み込まれた PLACE1008092 を、制限酵素 Xhol で切断して PLACE1008092 を切り出した。次に Xhol で切断してある pBluescript SK(-)と、切り出した PLACE1008092 を DNA ligation kit ver.2 (宝社製) を用いてライゲーションした。pBluescript SK(-)に組換えた PLACE1008092 の mRNA の in vitro 合成は、AmpliscribeTM T7 high yield transcription kit (Epicentre technologies 社製) を用いて行った。ハイブリダイゼーションおよび各 DNA スポットのシグナル値の解析は、前述の方法と同様に行った。プローブ濃度が $1 \times 10^7 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下では、プローブ濃度に比例したシグナル増加が無いことから、この濃度域でのシグナルの比較は困難と考えられ、シグナル強度が 40 以下のスポットは一様に低レベルのシグナルとした。 $1 \times 10^7 \sim 0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲でプローブ濃度依存的なシグナル値の増加があり、検出感度としてはサンプルあたり発現量比が 1:100,000 の mRNA の検出感度である。この解析の結果、PLACE1003238 はこれらどの組織でも発現が低かった。

[実施例 4] 神経細胞分化関連遺伝子の解析

神経細胞の分化に関する遺伝子は、神経疾患の治療に有用な遺伝子である。神経系の細胞を分化誘導して発現変化する遺伝子は、神経疾患に関すると考えられる。

神経系の培養細胞NT2を分化誘導(レチノイン酸(RA)刺激)して発現変化する遺伝子を探査した。

NT2細胞の取扱いについては、基本的に付属のINSTRUCTION MANUALに従った。未分化NT2細胞とは、OPTI-MEM I (GIBCO BRL社製、カタログNo.31985)、10%(v/v) fetal bovine serum(GIBCO BRL社製)、1%(v/v) penicillin-streptomycin(GIBCO BRL社製)の培地で継代していたNT2細胞である。レチノイン酸存在下で培養したNT2細胞とは、未分化NT2細胞をD-MEM(GIBCO BRL社製、カタログNo.11965)、10%(v/v) fetal bovine serum、1%(v/v) penicillin-streptomycin、10μM Retinoic

acid(GIBCO BRL社製)のレチノイン酸添加培地に移した後、5週間継代後の細胞である。RA存在下で培養してさらに阻害剤を添加して培養したNT2細胞とは、レチノイン酸添加5週間を経たNT2細胞を細胞分裂阻害剤を添加した培地D-MEM(GIBCO BRL社製、カタログNo.11965)、10%(v/v) fetal bovine serum、1%(v/v) penicillin-streptomycin、10 μ M Retinoic acid、10 μ M FudR(5-Fluoro-2'-deoxyuridine : GIBCO BRL社製)、10 μ M Urd(Uridine : GIBCO BRL社製)、1 μ M araC(Cytosine β -D-Arabinofuranoside : GIBCO BRL社製)に移した後2週間後の細胞である。それぞれの細胞はトリプシン処理して回収後、total RNAの抽出を、S.N.A.P.^(TM) total RNA isolation kit (Invitrogen社製)を用いて行った。ハイブリダイゼーション用のプローブのラベリングは、このtotal RNA 10 μ gを用いて、前記の方法で同様にして行った。

データはn = 3で取得し、分化誘導刺激ありの細胞のシグナルと、なしの細胞のシグナルを比較した。比較には二標本t検定の統計処理を行って、シグナル値の分布に有意に差があるクローンを、p < 0.05で選択した。本解析は、シグナル値の低いクローンであっても差を統計的に検出できる。したがって40以下のシグナル値のクローンに対しても評価を行った。

未分化のNT2細胞、RA存在下で培養したNT2細胞、またはRA存在下で培養してさらに阻害剤を添加して培養したNT2細胞の、各cDNAの発現を測定した。

それぞれ細胞の各遺伝子についてシグナル値の平均 (M_1 , M_2) と標本分散 (s_1^2 , s_2^2) を求め、比較する2つの細胞の標本分散から合成標本分散 s^2 を求めた。t = $(M_1 - M_2)/s/(1/3+1/3)^{1/2}$ を求めた。自由度4としてt分布表の有意水準の確率Pである0.05と0.01のt値と比較して、値が大きい場合にそれぞれP<0.05、またはP<0.01で両細胞の遺伝子の発現に差があると判定した。PLACE1003238はRA/阻害剤で発現が増加した。このクローンは神経疾患に関するクローンである。

[実施例5] 紫外線傷害関連遺伝子の解析

紫外線は健康に少なからず影響を及ぼすことが知られている。近年はオゾン層

破壊に伴って紫外線傷害にさらされる機会が多くなっており、皮膚癌などの危険因子として認識されてきている (United States Environmental Protection Agency: Ozone Depletion Home Page、<http://www.epa.gov/ozone/>)。紫外線が皮膚表皮細胞に作用して発現変化する遺伝子は、皮膚の紫外線傷害に関すると考えられる。

紫外線照射した初代培養皮膚由来線維芽細胞を培養して、発現変化する遺伝子を探査した。初代培養皮膚由来線維芽細胞 (Cell Applications社製) は、培養皿にコンフルエントに培養して、254 nmの紫外線を10,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 照射した。細胞からのmRNAの抽出は、未照射の細胞、照射後4時間または24時間培養した細胞を対象に、FastTrack™ 2.0 mRNA isolation kit (Invitrogen社製) を用いて行った。ハイブリダイゼーション用のプローブのラベリングは、このmRNA 1.5 μg を用いて、前記の方法で同様にして行った。データはn = 3で取得し、紫外線刺激ありの細胞のシグナル値と、なしの細胞のシグナル値を比較した。比較には二標本t検定の統計処理を行って、シグナル値の分布に有意に差があるクローンを、p < 0.05で選択した。本解析は、シグナル値の低いクローンであっても差を統計的に検出できる。したがって40以下のシグナル値のクローンに対しても評価を行った。

紫外線未照射の皮膚由来線維芽細胞、および紫外線照射した皮膚由来線維芽細胞の、各cDNAの発現を測定した。

それぞれ細胞の各遺伝子についてシグナル値の平均 (M_1, M_2) と標本分散 (s_1^2, s_2^2) を求め、比較する2つの細胞の標本分散から合成標本分散 s^2 を求めた。t = $(M_1 - M_2)/s/(1/3+1/3)^{1/2}$ を求めた。自由度4としてt分布表の有意水準の確率Pである0.05と0.01のt値と比較して、値が大きい場合にそれぞれP<0.05、またはP<0.01で両細胞の遺伝子の発現に差があると判定した。この解析の結果、PLACE10 03238は、紫外線照射によって、4時間後または24時間後に発現が減少した。

[実施例6] 推定アミノ酸配列に対するシグナル配列、膜貫通領域および機能

ドメインの検索

PLACE1003238の推定アミノ酸配列に対して、アミノ末端のシグナル配列の有無と膜貫通領域の有無を予測、さらに蛋白質の機能ドメイン（モチーフ）検索を行った。アミノ末端のシグナル配列についてはPSORT [K. Nakai & M. Kanehisa, *Genomics*, 14: 897-911 (1992)]を、膜貫通領域についてはSOSUI [T. Hirokawa et. al. *Bioinformatics*, 14: 378-379 (1998)]（三井情報開発株式会社販売）を用いて解析を行った。機能ドメインの検索についてはPfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いた。PSORTやSOSUIにより、アミノ末端のシグナル配列や膜貫通領域が予測されたアミノ酸配列は分泌、膜蛋白質であると予測された。また、Pfamによる機能ドメイン検索において、ある機能ドメインにヒットしたアミノ酸配列はヒットデータをもとに、例えばPROSITE(<http://www.expasy.ch/cgi-bin/prosite-list.pl>)にある機能カテゴリー分類を参照にしてその蛋白質の機能予測することができる。また、PROSITEでの機能ドメインの検索も可能である。

PLACE1003238は、SOSUIにより推定アミノ酸配列に膜貫通領域が検出された。またPfamによりPLACE1003238の推定アミノ酸配列には7回膜貫通型受容態度メインを検出した。

[実施例7] 全長配列による機能カテゴリー分類

PLACE1003238についてGenBank、Swiss-Prot、UniGeneの各データベースを対象に行った相同性検索の結果や、全長塩基配列から推定されたアミノ酸配列に対するドメイン検索の結果から、クローン中にコードされるタンパク質の機能予測、カテゴリー分類を行った。PLACE1003238は、分泌・膜タンパク質、および糖タンパク質関連タンパク質に分類された。

[実施例8]

前記実施例で開示された、本発明のcDNAクローン(C-PLACE1003238)の塩基配列をサンガーフラスにて決定し、再度の確認を行なった。

試験方法

(1) 試薬

プラスミド抽出用試薬キット : QIAprep® Spin Miniprep Kit(QIAGEN)

塩基配列解析用試薬キット : ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems)

塩基配列解析用オリゴヌクレオチドプライマー : CP38-1からCP38-6までがC-PLACE1003238用のプライマーである。また、T7及びM13 Reverseはベクター上の、共通塩基配列解析用オリゴヌクレオチドプライマーである。各プライマーの塩基配列を以下に示した。

CP38-1: GTGTTTCCTGACACGGCATCT／配列番号：1 1

CP38-2: CTCTGCAGATACTTCAGT／配列番号：1 2

CP38-3: CATAAGTCAGTCAAGCCGAA／配列番号：1 3

CP38-4: TCTGCACAAGTGATATGGTA／配列番号：1 4

CP38-5: CAAATGGCTTGACCACCTTC／配列番号：1 5

CP38-6: AGGGTGGTGTCTTCCTGG／配列番号：1 6

T7: TAATACGACTCACTATAGGG／配列番号：1 7

M13 Reverse: CAGGAAACAGCTATGAC／配列番号：1 8

(2) 組換えプラスミドによる大腸菌の形質転換

1) C-PLACE1003238 クローンは、実施例1に示す方法によりクローニングされた。この組換えプラスミドを以下に記載する方法で大腸菌 DH5 α 株に導入した。

2) DH5 α 株のコンピテントセル (Competent high E. coli DH5 α : 東洋紡) を 1.5 mL 用エッペンドルフチューブに 20 μ L 分注し、プラスミド溶液を極微量(約 0.1 μ L) 添加して、氷中に約 30 分間静置した。

3) チューブを水浴に浸し、42°Cにて 45 秒間加温した。

- 4) チューブを氷中に約 2 分間静置した。
- 5) 大腸菌液の 20 μ L および 200 μ L をアンビシリン（終濃度 100 μ g/mL）を含む寒天培地プレート上にそれぞれ滴下し、コンラージ棒で広げた。この寒天培地プレートを 37°C にて一晩培養し、アンビシリン耐性の形質転換株を得た。

(3) プラスミド抽出

- 1) 形質転換株を寒天培地プレート上の単離コロニーを探り、Terrific Broth 培地に植菌して 37°C にて一晩培養した。
 - 2) 培養液を 2 mL エッペンドルフチューブに移し、遠心分離して集菌した。沈殿に 250 μ L の P1 緩衝液（キットに添付：RNase A を含む）を添加して再懸濁した。
 - 3) 250 μ L の P2 緩衝液（キットに添付）を添加して溶菌させた後、350 μ L の N3 緩衝液（キットに添付）を添加して中和した。
 - 4) チューブを 12,000 回転にて 10 分間遠心した後に、上清をスピニカラム（キットに添付）に上層して 12,000 回転にて 1 分間遠心した。
 - 5) カラムを 750 μ L の PE 緩衝液（エタノールを含む：キットに添付）で洗浄した後、プラスミド DNA を 100 μ L の TE 緩衝液（10 mmol/L トリス塩酸、1 mmol/L EDTA、pH 8.0）で溶出した。
 - 6) プラスミド DNA 溶液の一部を TE 緩衝液で 20 倍希釈して (30 μ L / 570 μ L) 260 nm での吸光度を測定し、DNA 濃度を算出した。
- #### (4) 塩基配列の解析
- 1) プラスミド DNA 約 500 ng を Polymerase-Chain Reaction (PCR) チューブ内で 8 μ L のプレミックス（キットに添付）、3.2 pmol の塩基配列決定用プライマー、および精製水と混合して総量 20 μ L とし、PCR を行った。PCR 条件は、96°C 3 分間 → 96°C 10 秒間、50°C 5 秒間、60°C 4 分間を 25 サイクル → 4 °C に冷却、とした。
 - 2) 0.2mL PCR チューブ上にセットした 96 穴カラムに PCR 産物を上層し、2,000

回転で 5 分間遠心して未反応の dNTP を除いた後、陰圧下で乾燥させた。96 穴カラムは、96 穴フィルターブレート（マルチスクリーン-HV ブレート：ミリポア）に一定量のカラム粒子（Sephadex G-50 Medium：アマシャム・ファルマシア・バイオテク）をカラムローダー（マルチスクリーン 45 μL カラムローダー：ミリポア）にて分取して充填し、精製水 300 μL を添加して約 2 時間膨潤させた後、2,000 回転で 5 分間遠心したもの用いた。

3) 各 PCR チューブに 20 μL の Template suppression reagent (PE Biosystems) を添加して乾燥した PCR 産物を溶解させた後、96°C にて約 2 分間加熱し、氷中で急冷した。

4) 各チューブを塩基配列解析装置にセットした後、塩基配列解読のための操作を行った。本機器の運転方法は、製作会社により作成された使用マニュアルに従つた。

塩基配列解析の結果、C-PLACE1003238 の塩基配列は前記の実施例の結果と一致した。

同配列は 1077 塩基の ORF (配列番号：1 の第 362 番目から第 1435 番目) を持つ。ORF から予想されるアミノ酸配列 (358 アミノ酸、配列番号：2) は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していた。図 1 から 3 を参照のこと。このことから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが示唆された。

[実施例 9]

C-PLACE1003238 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、GenBank に対して BLAST2.05 (Nucleic Acids Res., 25, p3389–3402, 1997) を用いて検索した。その結果を図 1 から 3 に示した。また、代表的な既知の G 蛋白質共役型受容体との結果を表 1 に再掲した。

表 1

| 既知の G 蛋白質共役型受容体 | C-PLACE1003238 との相同性(%) |
|---------------------------------|-------------------------|
| THROMBIN RECEPTOR 2 (HUMAN) | 24 |
| CCR4 (CKR4 HUMAN) | 22 |
| PAF Receptor (PAFR HUMAN) | 25 |
| CXCR4 (CCR4 HUMAN) | 24 |
| P2Y PURINOCEPTOR 1 (P2YR HUMAN) | 24 |
| P2Y4 Receptor (P2Y4 HUMAN) | 22 |

C-PLACE1003238 から推定されるアミノ酸配列は既知の G 蛋白質共役型受容体に對して相同性がそれほど高くないことから、本遺伝子によりコードされる蛋白質は G 蛋白質共役型受容体として新規なものであることが示唆された。

[実施例 10]

本発明の新規 G 蛋白質共役型受容体の遺伝子である C-PLACE1003238 のヒト正常組織での発現部位を検討した。

試験方法

(1) 試薬

C-PLACE1003238 発現解析用 polymerase chain reaction (PCR) プライマー：センスプライマーおよびアンチセンスプライマーは遺伝子解析ソフトウェア Vector NTI ver.5.2 (Informax) を用いて設計・製造した。プライマーの塩基配列を以下に示す。このプライマーは、113 塩基対の PCR 産物を生成する。

センスプライマー : AGTCACCTATGTGAACAGCT / 配列番号 : 19

アンチセンスプライマー : ACTGACTTATGAATTGCCTG / 配列番号 : 20

ヒト RAPID-SCAN™ GENE EXPRESSION PANEL : 24 種のヒト組織 mRNA に由来する cDNA を 4 段階の濃度で 96 ウェルプレート中に調製したもの (Origene Technologies Inc.) を用いた。DNA polymerase は、TaKaRa LA Taq™ (宝酒造) を使用

した。

(2) PCR 反応

- 1) RAPID-SCAN プレートを 4°C から室温に移し、静置した。
- 2) 以下の組成の反応溶液を 15 mL ファルコンチューブ内に調製し、氷中で保冷した。

調製容量

| | |
|---------------------------|---------|
| 10×LA Taq PCR 緩衝液* | 300 μL |
| 25mM MgCl ₂ | 300 μL |
| dNTP (各 2 mM) * | 300 μL |
| センスプロライマー (10 pmol/μL) | 120 μL |
| アンチセンスプロライマー (10 pmol/μL) | 120 μL |
| 精製水 | 1848 μL |
| LA Taq (5 U/μL) | 12 μL |
| | |
| 総量 | 3000 μL |

*酵素に添付された試薬を使用した。

- 3) RAPID-SCAN プレートの 1 ウェルあたり、調製した反応溶液を 25 μL ずつ分注し、ミネラルオイルを 2,3 滴 重層した。
- 4) プレートをプラスティックカバーシートで被い、15 分間氷上で静置した。
- 5) プレートをサーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler MP: 宝酒造) にセットし、以下の運転プログラムで反応させた。すなわち、95°C 2 分間を 1 サイクル → 95°C 15 秒間、55°C 30 秒間、72°C 1 分間を 35 サイクル → 72°C 5 分間を 1 サイクル、とした。

(3) アガロースゲル電気泳動

- 1) PCR 産物 6 μL を 1 μL の 6×泳動用色素液と混合し、泳動装置 Mupid (コスモバイオ) にセットした 3%アガロースゲル (Nusieve 3:1 agarose, FMC BioProducts) にアプライした。
- 2) 100 V の定電圧で 40 分間泳動した。なお、泳動用緩衝液にはトリス-ホウ酸緩衝液を用いた。
- 3) 紫外線照射下で PCR 産物の泳動像を撮影した。

1 ng の cDNA を鋳型に用いて PCR 産物の電気泳動を行い、本発明の C-PLACE1003238 のヒト正常組織での発現分布を確認した。その結果、C-PLACE1003238 クローンに相当する遺伝子の発現は、以下の順であった（表2）。

表2

| 発現の強さ | 組織名 |
|----------|---|
| +++ | 肺、胎盤、皮膚 |
| ++ | 精巣、卵巣、前立腺、副腎 |
| + | 脳、腎臓、唾液腺、白血球、骨髄 |
| -：検出限界以下 | 心臓、脾臓、肝臓、結腸、小腸、骨格筋、胃、甲状腺、胰臓、子宮、胎児脳、胎児肝臓 |

[実施例 11]

ヒト新規 cDNA クローン C-PLACE1003238 の病態への関与を推定することを目的として、ヒト癌組織並びにアルツハイマー病脳組織における発現量を正常組織における発現量と比較検討した。

試験方法

(1) 試薬

Polymerase chain reaction (PCR)用プライマー：C-PLACE1003238 発現解析用

センスプライマーおよびアンチセンスプライマーは、ともに前の実施例で設計したもの用いた。また、内在性コントロールとしてヒト glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) を用いた。その発現解析用に使ったプライマーの配列を以下に示す。

センスプライマー : ACCACAGTCCATGCCATCAC／配列番号：2 1

アンチセンスプライマー : TCCACCACCCCTGTTGCTGTA／配列番号：2 2

なお、本プライマーセットは、452 塩基対の PCR 産物を生成する。

患者組織由来 cDNA : 前立腺、結腸、胃、脾臓、精巣、及び脳腫瘍由来の cDNA について、正常人及び癌患者由来の対応する組織由来の cDNA を BioChain Institute から購入して用いた。アルツハイマー病患者由来の cDNA について、アルツハイマー病患者および正常成人の前頭葉及び海馬に由来する cDNA を BioChain Institute から購入して用いた。

DNA ポリメラーゼは、 TaKaRa LA TaqTM (宝酒造) を用いた。

(2) PCR 反応

1) 以下の組成のマスター mix 反応溶液を 1.5 mL エッペンドルフチューブ内に調製し、氷中で保冷した。

調製容量

| | |
|--------------------------|-------|
| 10×LA Taq PCR 緩衝液* | 50 μL |
| 25mM MgCl ₂ | 50 μL |
| dNTP (各 2 mM) * | 50 μL |
| センスプライマー (10 pmol/μL) | 20 μL |
| アンチセンスプライマー (10 pmol/μL) | 20 μL |

40

| | |
|-----------------------|-------------|
| 精製水 | 288 μ L |
| LA Taq (5 U/ μ L) | 2 μ L |

総量 480 μ L

*酵素に添付された試薬を使用した。

2) PCR 用 8 連チューブ 200 μ L 入りに 24 μ L づつ分注後、鑄型 DNA を各々 1 μ L 入れ、キャップを閉めサーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler MP : 宝酒造) にセットし、以下の運転プログラムで反応させた。すなわち、95°C 2 分間を 1 サイクル → 95°C 15 秒間、55°C 30 秒間、72°C 1 分間を 25 サイクル (G3PDH) または 40 サイクル (C-PLACE1003238) → 72°C 5 分間を 1 サイクル、とした。

(3) アガロースゲル電気泳動

1) PCR 産物 6 μ L を 1 μ L の 6×泳動用色素液と混合し、泳動装置 Mupid (コスマバイオ) にセットした 1% または 3% アガロースゲル (Nusieve 3:1 agarose, FMC BioProducts) にアプライした (それぞれ、G3PDH と C-PLACE1003238)。

2) 100 V の定電圧で 40 分間泳動した。

3) 紫外線照射下で PCR 産物の泳動像を撮影した。

内部標準である G3PDH の cDNA 量を指標として、各サンプルの濃度を均一にした。G3PDH を PCR 増幅し電気泳動を行ったのち、目測で DNA 量を判定し濃度の高いものを希釈することにより濃度差を減少させた。これを繰り返すことにより、G3PDH の cDNA 量が電気泳動上ほとんど差がないところまで調整した。

次に、C-PLACE1003238 遺伝子の病態での発現変化を検討するために、上記の標準化された鑄型 cDNA を用いて、C-PLACE1003238 の PCR 反応を行った。結果を表 3 に示す。

表3

| 病態 | 組織 | C-PLACE1003238 の発現の強さ | |
|---------|-----|-----------------------|------|
| | | 病態組織 | 正常組織 |
| 癌 | 結腸 | + | ± |
| | 肺臓 | + | ± |
| | 精巣 | + | ++ |
| アルツハイマー | 前頭葉 | ± | + |
| | 海馬 | + | ± |

腫瘍組織での C-PLACE1003238 の発現を正常人での発現と比較した結果、正常人では結腸及び肺臓においてほとんど発現していなかったが、結腸癌及び肺臓癌では強く発現していることが分かった。また、同様にアルツハイマー病患者の脳（前頭葉及び海馬）における C-PLACE1003238 遺伝子の発現量を正常成人における発現量と比較した結果、正常人では前頭葉及び海馬で発現が見られるが、アルツハイマー病患者の前頭葉では発現が減少し、海馬では増加していることが分かった。

本発明の C-PLACE1003238 は癌の診断（結腸癌、肺臓癌、精巣癌）やアルツハイマー病の診断、さらには予防・治療薬のスクリーニングに応用できる可能性のあることが示唆された。

[実施例 12]

本発明の cDNA を担持するベクターを構築した。C-PLACE1003238 の翻訳開始コドン ATG の数塩基上流部から stop コドンを含む下流部分までを PCR により増幅し、発現ベクター pCEP4 へのサブクローニングを行った。

産業上の利用の可能性

本発明により、新規な G 蛋白質共役型受容体 (C-PLACE1003238)、当該蛋白質をコードする遺伝子、当該遺伝子を含むベクター、当該ベクターを含む宿主細胞

、当該蛋白質の製造方法が提供された。さらに、当該蛋白質の活性を修飾する化合物のスクリーニング方法が提供された。すなわち、当該遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストあるいはアンタゴニストのスクリーニングに使用できる。本発明の蛋白質やその遺伝子、または蛋白質の活性を修飾する化合物は、本発明の G 蛋白質共役型受容体蛋白質が関与する疾患の新しい予防または治療剤の開発への利用が期待される。

請求の範囲

1. グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA。
 - (a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。
 - (b) 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。
 - (c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。
 - (d) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAにストリン杰ントな条件下でハイブリダイズするDNA。
2. 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA。
3. 請求項1または2に記載のDNAを含有するベクター。
4. 請求項1または2に記載のDNAまたは請求項3に記載のベクターを保持する形質転換体。
5. 請求項1または2に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド。
6. 請求項4に記載の形質転換体を用いて蛋白質またはペプチドを発現させる工程、および発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、請求項5に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。
7. 請求項5に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であつて、
 - (a) 請求項5に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、
 - (b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。
8. 請求項5に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であつて、

(a) 被検試料の存在下で請求項 5 に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

9. 請求項 5 に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 請求項 5 に記載の蛋白質に結合する抗体。

11. 請求項 7 から 9 のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物。

12. 請求項 11 に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物。

13. 配列番号： 1 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド。

1 / 3

図 1

| Sequence | | | | | |
|---------------------------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|
| C-PLACE1003238 (PLACE1003238) | | | | | |
| PROBABLE_GPCR (K101_HUMAN) | | | : 相同性= 44 % | | |
| PAFR_homolog (PAFR_hom) | | | : 相同性= 26 % | | |
| THROMBIN_RECECTOR2 (PAR3_HUMAN) | | | : 相同性= 24 % | | |
| P2Y-like (P2Y_like) | | | : 相同性= 25 % | | |
| CCR4 (CKR4_HUMAN) | | | : 相同性= 22 % | | |
| EBV-INDUCED_GPCR (EBI2_HUMAN) | | | : 相同性= 23 % | | |
| PAF_Receptor (PAFR_HUMAN) | | | : 相同性= 25 % | | |
| CXCR4 (CCR4_HUMAN) | | | : 相同性= 24 % | | |
| P2Y_PURINOCEPTOR1 (P2YR_HUMAN) | | | : 相同性= 24 % | | |
| P2Y4_Receptor (P2Y4_HUMAN) | | | : 相同性= 22 % | | |
| ----- | | | | | |
| PLACE1003238 | MGFNLTAKL | PNNELHGQES | HNSGNRSQGP | GKNTTLHNEF | DTIVLPVLYL |
| K101_HUMAN | ----- | ----- | MINSTSTQPP | DESCSQNLLI | TQQIIPVLYC |
| PAFR_hom | ----- | ----- | -----MT | NSSFFCPVYK | DLEPFTYFFY |
| PAR3_HUMAN | FSALEGWTGA | TITVKIKCPE | ESASHLHVKN | ATMGYLTSLL | STKLIPAIYL |
| P2Y_like | -KLSGSDSSQ | SMNGLEVAPP | GLTNFSLAT | AEQCGQETPL | ENMLFASFYL |
| CKR4_HUMAN | --MNPTDIA | DTTLDESIYS | NYLYYESIPK | PCTKEGIKAF | GELFLPPLYS |
| EBI2_HUMAN | ----- | -MDIQMANNF | TPPSATPQGN | DCDLYAHHST | ARIVMPHLHS |
| PAFR_HUMAN | ----- | ----- | -----MEP | HDSSHMDSEF | RYTLPPIVYS |
| CCR4_HUMAN | --MEGISI | YTSDNYTEEM | GSGDYDSMKE | PCFREENANF | NKIFLPTIYS |
| P2YR_HUMAN | -NGTDAAFLA | GPGSSWGNST | VASTAAVSSS | FKCALTKTGF | QFYYLPAVYI |
| P2Y4_HUMAN | -----MAS | TESSLRLSLG | LSPGPGSSEV | ELDCWFDED | KFILLPVSYA |
| ----- | | | | | |
| ---TM1 | | | ---TM2 | | |
| PLACE1003238 | IIFVASILLN | GLAVWIFFFH | RNK--TSFI | FYLKNIVVAD | LIMTLTFPFR |
| K101_HUMAN | MVFIAGILLN | GVSGWIFFYV | PSS---KSF | IYLNIVIA | FVMSLTFPFK |
| PAFR_hom | LVFLVGIIGS | CFATWAFIQK | NTNH--RCVS | IYLINLLTAD | FLLTLALPVK |
| PAR3_HUMAN | LVFVVGVPAN | AVTLWMLFFR | TRS---ICTT | VFTYNLAIA | FLFCVTLPPK |
| P2Y_like | LDFILALVGN | TLALWLFIIRD | HKSG--TPAN | VFLMHLAVAD | LSCVLVLPTR |
| CKR4_HUMAN | LVVFVGLLGN | SVVVVLFLKY | KRLR--SMTD | VYLLNLAISD | LLFVFSLPFW |
| EBI2_HUMAN | LVFIIGLVGN | LLALVVIVQN | RKKI--NSTT | LYSTNLVISD | ILFTTALPTR |
| PAFR_HUMAN | IIFVLGVIAN | GYVLWVFARL | YPCKKFNEIK | IFMVNLTMAD | MLFLITLPLW |
| CCR4_HUMAN | IIFLTGIVGN | GLVILVMGYQ | KKL--RSMTD | KYRLHLSVAD | LLFVITLPFW |
| P2YR_HUMAN | LVFIIGFLGN | SVAIWMVFVH | MKP--WSGIS | VYMFNLALAD | FLYVLTLPAL |
| P2Y4_HUMAN | VVFVLGLGLN | APTLWLFIFR | LRP--WDATA | TYMFHLALSD | TLYVLSLPTL |

2 / 3

☒ 2

| -----TM3----- | | | | | | |
|---------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-----|
| | | | | | | 150 |
| PLACE1003238 | IVHDAGFGPW | YFKFILCRYT | SVLFYANMYT | SIVFLGLISI | DRYLKVVVKPF | |
| KI01_HUMAN | IIGDSDLGPW | QLNVFVCRVS | AVLFYVNMYV | SIVFFGLISF | DRYYKIVKPL | |
| PAFR_hom | IVVDLGVPW | KLKIFHCQVT | ACLIYINMYL | SIIFLAFVSI | DRCLQLTHSC | |
| PAR3_HUMAN | IAYHNGNNW | VFGEVLCRAT | TVIFYGNMYC | SILLACISI | NRYLAIHVHF | |
| P2Y_like | LVYHFSGNHW | PFGEIAICRLT | GFLFYLNMYA | SIYFLTCISA | DRFLAIHVHPV | |
| CKR4_HUMAN | GYYAA--DQW | VFGLGLCKMI | SWMYLVGFYS | GIFFVMLMSI | DRYLAIHVAV | |
| EBI2_HUMAN | IAYYAMGFDW | RIGDALCRIT | ALVFYINTYA | GVNFMTCLSI | DRFIAVVHPL | |
| PAFR_HUMAN | IVYYQNQGNW | ILPKFLCNVA | GCLFFINTYC | SVAFLGVITY | NRFQAVTRPI | |
| CCR4_HUMAN | AV--DAVANW | YFGNFLCKAV | HVIYTVNLYS | SVLILAFISL | DRYLAIHVAT | |
| P2YR_HUMAN | IFYYFNKTDW | IFGDAMCKLQ | RFIFHVNLYG | SILFLTCISA | HRYSGVVYPL | |
| P2Y4_HUMAN | IYYYAAHNHW | PFGTEICKFV | RFLFYWNLYC | SVLFLTCISV | HRYLGICHPL | |
| -----TM4----- | | | | | | |
| | | | | | | 200 |
| PLACE1003238 | GDSRMYNITF | TKVLSVCVWV | IMAVLSPN | ILTNGQP--- | --TEDNIHDC | |
| KI01_HUMAN | WTSFIQSVSY | SKLLSVIVWM | LMLLLAVPN | ILTNSV--- | --REVTQIKC | |
| PAFR_hom | KIYRIQEPEGF | AKMISTVWV | MVLLIMVPNM | MIPIKDI--- | --KEKSNVGC | |
| PAR3_HUMAN | TYRGLPKHTY | ALVTCGLVWA | TVFLYMLPFF | ILKQEYY-LV | QPDITTCHDV | |
| P2Y_like | KSLKLRRPLY | AHLACAFLWV | VVAVAMAPLL | VSPQTVQ--- | --TNHTV-- | |
| CKR4_HUMAN | FSLRARTLTY | GVITSLATWS | VAVFASLPGF | LFSTCY--- | -TERNHETYCK | |
| EBI2_HUMAN | RYNKIKRIEH | AKGVCIFVWI | LVFAOTLPLL | INPMISK--- | -QEAERITCM | |
| PAFR_HUMAN | KTAQANTRKR | GISLSSLVIWV | AIVGAASYFL | ILDSTNTVPD | SAGSGNVTRC | |
| CCR4_HUMAN | NSQRPRKKLA | EKVVYVGWV | PALLTIPDF | IFANVSE--- | --ADD---- | |
| P2YR_HUMAN | KSLGRLKKKN | AICISVLVWL | IVVVAISPIL | FYSGTGV-- | -RKNKTITCY | |
| P2Y4_HUMAN | RALRWGRPRL | AGLLCLAVWL | VVAGCLVPNL | FFVTTSN--- | --KGTTVLCH | |
| -----TM5----- | | | | | | |
| | | | | | | 250 |
| PLACE1003238 | SKLKSPPLGVK | WHTAVTYVNS | CLFVAVLVIL | IGCYIAISRY | IHKSSRQF-- | |
| KI01_HUMAN | IELKSELGRK | WHKASNYIFV | AIFWIVFLLL | IVFYTAITKK | IFKSHLKSS- | |
| PAFR_hom | MEFKKEFGRN | WHLLTNFICV | AIFLNFSAI | LISNCLVIRQ | LYRNKD--- | |
| PAR3_HUMAN | HNTCESSSPF | QLYYFISLAF | FGFLIPFVLI | IYCYAAIIRT | LNAYDHRW-- | |
| P2Y_like | -VCLQLYREK | ASHHALVSLA | VAFTFPFITT | TCYLLIIRS | LRQGLRV-- | |
| CKR4_HUMAN | TKYSLNSTTW | KVLLSLEINI | LGLVIPLGIM | LFCYSMIIRT | LQHCK--- | |
| EBI2_HUMAN | EYPNFEETKS | LPWILLGACF | IGYVLPLIII | LICYSQICCK | LFRTAKONPL | |
| PAFR_HUMAN | FEHYEKGSVP | VIIIHIFIVF | SFFLVFLIL | FCNLVIIRTL | LMQPVQQ-- | |
| CCR4_HUMAN | ----RYICDR | FYPNDLWVVV | FQFQHIMVGL | ILPGIVILSC | YCIISKLSH | |
| P2YR_HUMAN | DTTSDEYLRS | YFIYSMCTTV | AMFCVPLVLI | LGCYGLIVRA | LIYKDLDN-- | |
| P2Y4_HUMAN | DTTRPEEFDH | YVFHSSAVMG | LLFGVPCVLT | LVCYGLMARR | LYQPLPG-- | |

3 / 3

☒ 3

| -----TM6----- | | | | | | |
|---------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-----|
| | | | | | | 300 |
| PLACE1003238 | ISQSSRKHKH | NQSIRVVAV | FFTFCFLPYHL | CRIPFTFSHL | DRLLDESAQK | |
| KI01_HUMAN | RNSTSVKKKS | SRNIFSIVFV | FFVCFVPYHI | ARIPTYKSQT | EAHYSCQSKE | |
| PAFR_hom | -ENYPNVKKA | LINILLVTG | YIICFVPYHI | VRIPYTLSQT | EVITDCSTRI | |
| PAR3_HUMAN | LW-----Y | VKASLLLILVI | FTICFAPSNI | ILIIHHANYY | YNNNTDG----- | |
| P2Y_like | --EKRLKTKA | VRMIAIVLAI | FLVCFVPYHV | NRSVYVLHYR | SHGASCATQR | |
| CKR4_HUMAN | --NEKKNKA | VKMIFAVVVL | FLGFWTVPYNI | VLFLETIVEL | EVLQDCTFER | |
| EBI2_HUMAN | TEKSGVNKKK | LNTIILIIIVV | FVLCFTPYHV | AIIQHMIKKL | RFSNFLECSQ | |
| PAFR_HUMAN | QRNAEVKRRA | LWMVCTVLAV | FIICFVPHHV | VQLPWTLAEL | GF-QDSKFHQ | |
| CCR4_HUMAN | SKGH-QKRKA | LKTTVILILA | FFACWLPPYYI | GISIDSFILL | EIIKGCGEFE | |
| P2YR_HUMAN | --SPLRRKS | IYLVIIIVLTV | FAVSYIPFHV | MKTMLRRL | DFQTPAMCAF | |
| P2Y4_HUMAN | SAQSSSRLRS | LRTIAVVLTV | FAVCFVPFHI | TRTIYYLARL | LE-ADCRVLN | |
| -----TM7----- | | | | | | |
| | | | | | | 350 |
| PLACE1003238 | --ILYYCKEI | TFLSACNCV | LDPIIYFFMC | RSFSRRLFKK | SNIRTRSEI | |
| KI01_HUMAN | --ILRYMKEF | TLLLASAANVC | LDPIIYFFLC | QPFRREILCKK | LHIPLQAQND | |
| PAFR_hom | --SLFKAKEA | TLLLAVSNIC | FDPILYHLS | KAFR---SKV | TETFASPKE | |
| PAR3_HUMAN | --LYFIYLI | ALCLGSLNSC | LDPFLYFLMS | KTRNHSTAYL | TK----- | |
| P2Y_like | --ILALANRI | TSCLTSLNGA | LDPIIMYFFVA | EKFRHALCNL | LCG-KRLKGP | |
| CKR4_HUMAN | --YLDYAIQA | TETLAFVHCC | LNPIIYFFLG | EKFRKYILQL | FKTCRGLFVL | |
| EBI2_HUMAN | RHSFQISLHF | TVCLMNFNCC | MDPFIYFFAC | KGYK---RKV | MRMLKRQSV | |
| PAFR_HUMAN | --AINDAHQV | TLCLLSTNCV | LDPVIYCFLT | KKFRKHILTEK | -----F | |
| CCR4_HUMAN | N-TVHKWISI | TEALAFFHCC | LNPILYAFLG | AKFKTSQHQA | LTSVSRGSSL | |
| P2YR_HUMAN | NDRVYATYQV | TRGLASLNSC | VDPILYFLAG | DTFRRRLSRA | TR----- | |
| P2Y4_HUMAN | --IVNVVYKV | TRPLASANSC | LDPVLYLLTG | DKYRRQLRQL | CGGGKQOPRT | |
| ----- | | | | | | |
| | | | | | | 371 |
| PLACE1003238 | RSLQSVRRSE | VRIYYDYTDV | - | - | - | |
| KI01_HUMAN | LDISRIKRGN | TTLESTDTC | - | - | - | |
| PAFR_hom | KAQKEKLRC | NN----- | - | - | - | |
| PAR3_HUMAN | ----- | ----- | - | - | - | |
| P2Y_like | PPSFEGKTNE | SSLSAKSE-- | - | - | - | |
| CKR4_HUMAN | CQYCGLLQIY | SADTPSSSYT | Q | - | - | |
| EBI2_HUMAN | SISSAVKSAP | EENSREMTE- | - | - | - | |
| PAFR_HUMAN | YSMRSSRKCS | RATTDTVTEV | - | - | - | |
| CCR4_HUMAN | KILSKGKRGG | HSSVSTESE- | - | - | - | |
| P2YR_HUMAN | --KASRRSE | ANLQSKSEDM | - | - | - | |
| P2Y4_HUMAN | AASSLALVSL | PEDSSCR--- | - | - | - | |

1/11

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> Novel G protein-coupled receptors and genes encoding them, and their production and use.

<130> H1-107PCT11

<140>

<141>

<150> JP 1999-248036

<151> 1999-07-29

<150> JP 1999-300253

<151> 1999-08-27

<150> JP 2000-118776

<151> 2000-01-11

<150> JP 2000-183767

<151> 2000-05-02

<150> US 60/159,590

<151> 1999-10-18

2/11

<150> US 60/183, 322

<151> 2000-02-17

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1498

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (362)..(1435)

<400> 1

ttacatttagc aagagagcaa gttgttccag tagttgcctg gcaggagaat ttgaaagggt 60
gccccaaagg acaatctcta aaggggtaag ggagataacct accttgtctg gtaggggaga 120
tgttcgttt tcatgcittha ccagaaaatc cacttccctg ctgacacctag tttcaaagct 180
tattcttaat tagagacaag aaacctgttt caacttgaag acaccgtatg aggtgaatgg 240
acagccagcc accacaatga aagaaatcaa accaggaata acctatgctg aaccacgccc 300
tcaatcgccc ccaagtgttt cctgacacgc atcttgctt acagtgcatac acaactgaag 360
aatggggttc aacttgacgc ttgcaaaatt accaaataac gagctgcacg gccaagagag 420
tcacaattca ggcaacagga ggcacgggcc agggaaaac accacccttc acaatgaatt 480

3/11

tgacacaatt gtcttgcgg tgcttatct cattatattt gtggcaagca tcttgctgaa 540
tggtttagca gtgtggatct tttccacat taggaataaa accagctca tattctatct 600
caaaaacata gtggttgcag acctcataat gacgctgaca ttccatttc gaatagtcca 660
tcatgcagga tttggacctt ggtacttcaa gtttattctc tgcagataca cticagttt 720
gttttatgca aacatgtata ctccatcggt gttccttggg ctgataagca ttgatcgcta 780
tctgaaggta gtcaagccat ttggggactc tcggatgtac aacataacct tcacgaagg 840
tttatctgtt tgtgtttggg tgatcatggc tggtttgtct ttgc当地 aca tcatcctgac 900
aatggtcag ccaacagagg acaatatcca tgactgctca aaacttaaaa gtc当地 tggg 960
ggtaaaatgg catacggcag tcacctatgt gaacagctgc ttgttggc ccgtgctggt 1020
gattctgatc ggatgttaca tagccatatac caggtacatac cacaaatcca gcaggcaatt 1080
cataagtcag tcaagccgaa agcgaaaaca taaccagagc atcagggttg ttgtggctgt 1140
gttttttacc tgcttctac catatcaattt gtgc当地 attt ctttactt tttagtcaattt 1200
agacaggctt tttagatgaat ctgc当地 aaaaattt aatcctatata tactgcaaag aaatttacact 1260
tttcttgc当地 gggttgc当地 ttgc当地 tggc当地 tccaaataatt tacttttca tggttaggtc 1320
atttcaaga aggctgtca aaaaatcaaa tatcagaacc aggagtgaaa gcatcagatc 1380
actgcaaagt gtgagaagat cggaagttcg catatattt gattatactg atgtgttaggc 1440
cttttatgti ttgttggaaat cgatatgtac aaagtgtaaa taaatgttca ttttcattt 1498

<210> 2

<211> 358

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Phe Asn Leu Thr Leu Ala Lys Leu Pro Asn Asn Glu Leu His

4/11

i 5 10 15
Gly Gln Glu Ser His Asn Ser Gly Asn Arg Ser Asp Gly Pro Gly Lys
20 25 30
Asn Thr Thr Leu His Asn Glu Phe Asp Thr Ile Val Leu Pro Val Leu
35 40 45
Tyr Leu Ile Ile Phe Val Ala Ser Ile Leu Leu Asn Gly Leu Ala Val
50 55 60
Trp Ile Phe Phe His Ile Arg Asn Lys Thr Ser Phe Ile Phe Tyr Leu
65 70 75 80
Lys Asn Ile Val Val Ala Asp Leu Ile Met Thr Leu Thr Phe Pro Phe
85 90 95
Arg Ile Val His Asp Ala Gly Phe Gly Pro Trp Tyr Phe Lys Phe Ile
100 105 110
Leu Cys Arg Tyr Thr Ser Val Leu Phe Tyr Ala Asn Met Tyr Thr Ser
115 120 125
Ile Val Phe Leu Gly Leu Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Lys Val Val
130 135 140
Lys Pro Phe Gly Asp Ser Arg Met Tyr Asn Ile Thr Phe Thr Lys Val
145 150 155 160
Leu Ser Val Cys Val Trp Val Ile Met Ala Val Leu Ser Leu Pro Asn
165 170 175
Ile Ile Leu Thr Asn Gly Gln Pro Thr Glu Asp Asn Ile His Asp Cys
180 185 190
Ser Lys Leu Lys Ser Pro Leu Gly Val Lys Trp His Thr Ala Val Thr
195 200 205
Tyr Val Asn Ser Cys Leu Phe Val Ala Val Leu Val Ile Leu Ile Gly

5/11

210 215 220
Cys Tyr Ile Ala Ile Ser Arg Tyr Ile His Lys Ser Ser Arg Gln Phe
225 230 235 240
Ile Ser Gln Ser Ser Arg Lys Arg Lys His Asn Gln Ser Ile Arg Val
245 250 255
Val Val Ala Val Phe Phe Thr Cys Phe Leu Pro Tyr His Leu Cys Arg
260 265 270
Ile Pro Phe Thr Phe Ser His Leu Asp Arg Leu Leu Asp Glu Ser Ala
275 280 285
Gln Lys Ile Leu Tyr Tyr Cys Lys Glu Ile Thr Leu Phe Leu Ser Ala
290 295 300
Cys Asn Val Cys Leu Asp Pro Ile Ile Tyr Phe Phe Met Cys Arg Ser
305 310 315 320
Phe Ser Arg Arg Leu Phe Lys Lys Ser Asn Ile Arg Thr Arg Ser Glu
325 330 335
Ser Ile Arg Ser Leu Gln Ser Val Arg Arg Ser Glu Val Arg Ile Tyr
340 345 350
Tyr Asp Tyr Thr Asp Val
355

<210> 3

<211> 30

<212> RNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligo-cap linker sequence

<400> 3

6/11

| | |
|---|----|
| agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg | 30 |
| | |
| <210> 4 | |
| <211> 42 | |
| <212> DNA | |
| <223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized oligo(dT) primer sequence | |
| <400> 4 | |
| gcggctgaag acggcctatg tggcctttt tttttttt tt | 42 |
| | |
| <210> 5 | |
| <211> 21 | |
| <212> DNA | |
| <223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence | |
| <400> 5 | |
| agcatcgagt cggccttgtt g | 21 |
| | |
| <210> 6 | |
| <211> 21 | |
| <212> DNA | |
| <223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence | |
| <400> 6 | |
| gcggctgaag acggcctatg t | 21 |

7/11

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

tacggaagtg ttacttctgc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

tgtggaggt ttttctcta

20

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

gtttcccg tcacgac

17

<210> 10

<211> 17

8/11

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

caggaaacag ctatgac

17

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

gtgtttccctg acacgcatact

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

ctctgcagat acacttcagt

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer se

9/11

quence

<400> 13

cataaggtag tcaagccgaa

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

tctgcacaag tgatatggta

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

caaatggctt gaccaccc

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

10/11

agggtggtgt tctttcctgg 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

taatacgact cactataggg 20

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

cagggaaacag ctatgac 17

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

agtccacctat gtgaacagct 20

11/11

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 20

actgacttat gaattgcctg

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 21

accacagtcc atgccccatcac

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 22

tccaccaccc tggcgctgtta

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.C1⁷ C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12P21/02,
 C07K14/705, 16/28, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ
 PIR/SWISSPROT/GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P, X | WO, 99-63087, A1 (MILLENNIUM PHARM INC.), 09 December, 1999 (09.12.99), Full text; Fig. 1 & AU, 9945449, A | 1-13 |
| P, X | WO, 2000-08133, A1 (MERCK&CO INC.), 17 February, 2000 (17.02.00), Full text; Figs. 1 to 2 (Family: none) | 1-13 |
| X | WO, 99-29849, A1 (INCYTE PHARM INC.), 17 June, 1999 (17.06.99), Full text; Fig. 3 & EP, 1037980, A1 & US, 6063596, A | 1-13 |
| A | WO, 98-50549, A2 (HUMAN GENOME SCI INC.), 12 November, 1998 (12.11.98), Full text & EP, 1007670, A2 & US, 6060272, A | 1-13 |
| A | EP, 913471, A2 (SMITHKLEINE BEECHAM INC.), 06 May, 1999 (06.05.99), Full text | 1-13 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | | | |
|-----|---|-----|--|
| "A" | Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" | earlier document but published on or after the international filing date | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" | document member of the same patent family |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 13 October, 2000 (13.10.00) | Date of mailing of the international search report 24 October, 2000 (24.10.00) |
|--|---|

| | |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05069

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | & JP, 11-235184, A DNA Research, 1, 1994 SATO S. et al., "Prediction of the coding sequence of unidentified human genes.1.The coding sequences of 40 new genes(KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1", pp.27-35 | 1-13 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05069

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12P21/02,
C07K14/705, 16/28, C12Q1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ
PIR/SWISSPROT/GENESEQ

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| P, X | WO, 99-63087, A1 (MILLENNIUM PHARM INC.) 9. 12月. 1999 (9. 12. 99) 全文, 図1 & AU, 9945449, A | 1-13 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理髣の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 10. 00

国際調査報告の発送日 24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4B 9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05069

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| P, X | WO, 2000-08133, A1 (MERCK&CO INC.) 17. 2月. 2000 (17. 02. 00) 全文, 図1-2 (ファミリーなし) | 1-13 |
| X | WO, 99-29849, A1 (INCYTE PHARM INC.) 17. 6月. 1999 (17. 06. 99) 全文, 図3 & EP, 1037980, A1 &US, 6063596, A | 1-13 |
| A | WO, 98-50549, A2 (HUMAN GENOME SCI INC.) 12. 11月. 1998 (12. 11. 98) 全文 & EP, 1007670, A2 &US, 6060272, A | 1-13 |
| A | EP, 913471, A2 (SMITHKLINE BEECHAM INC.) 6. 5月. 1999 (06. 05. 99) 全文 & JP, 11-235184, A | 1-13 |
| A | DNA Research, 1, 1994 SATO S. et al., "Prediction of the coding sequence of unidentified human genes. 1. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1", p. 27-35 | 1-13 |